


① BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND  DEUTSCHES PATENTAMT	② Offenlegungsschrift ③ DE 39 37 649 A 1 ④ Abkürzungen: P 39 37 649 4 ⑤ Anmeldetag: 11. 11. 89 ⑥ Offenlegungstag: 16. 5. 91	⑦ Inv.-G.- C 12 N 1/20 C 08 G 53/06 A 61 K 8/58 A 61 L 12/00 A 61 L 27/00 A 61 L 31/00 C 06 M 5/00 C 06 L 61/04 C 27 F 1/04 C 12 H 1 05, 1 03, 1 04 1 045 1 365, 1 35
⑧ Anmelder: Boehringer Ingelheim KG 6507 Ingelheim, DE	⑨ Erfinder: Steinbachtel, Alexander, Dr., 3490 Göttingen, DE; Schüttgel, Hans-Günther, Prof. Dr., 3405 Bielefeld, DE; Tamm, Armut, 3800 Greutungen, DE	
⑩ Polyester auf der Basis von 4-Hydroxybenzoesäuren und Verfahren zu ihrer Herstellung Die vorliegende Erfindung betrifft Polyester auf der Basis von 4-Hydroxybenzoesäuren, das Verfahren zu ihrer Herstellung, die dazu benötigten Reaktionskatalysatoren und die Verwendung der erfindungsgemäßen Polyester.		

DE 39 37 649 A 1



I
Beschreibung

Insbesondere betrifft die Erfindung Polyester auf der Basis von C₆-bis-4-Hydroxyalkansäuren, besonders bevorzugt Polyester auf der Basis von 4-Hydroxybuttersäure.

Es ist bekannt, daß bestimmte Bakterien in der Lage sind, Polyester aus 3-Hydroxybuttersäure-Resten intrazellulär abzubauen. Derartige Polyester finden sich als Granula insbesondere in Zellen obligat aerobier Mikroorganismen bzw. Paraoxidationsorganismen. Diese Polyester liegen granulär ähnlich als Polymere der D,L-3-Hydroxybuttersäure vor (Dawcs, E. und P. J. Senior, *Journal of Microbiology*, 1963, 25, 187-192).

Arch. Microbiol. Physiol. 14, 263–266, 1973).

Die bisher bekannten, über mikrobiologische Verfahren erhaltenen, biologisch abbaubaren Polymeren aus gesättigter, aliphatischer Hydroxycarbonsäurebindungen (Alkanolactide) weichen mit Hilfe von Alkaligenen europolymerisierbar sind, bestehen aus Copolymeren mit der einwieder aus 3-Hydroxybuttersäure (3HB) und 4-Hydroxyvaltersäure (4HB) mit zufällig variierendem Anteil an Butyrolactid (4BL) oder aliphatischen, gesättigten Dicarbonsäuren (10, 16, 36–37). Infolge der einwiegigen, linearen, Gemisch aus zwei verschiedenen 3-Hydroxyalkansäuren entstehen (DI-OS 36 (1) 23), EP-A 2.81.801).

Bisher ist kein Herstellungsverfahren für ionomere Polymere aus 4-Hydroxycarbonsäuren bekannt. Remontierbare Polymere finden großes Interesse im Bereich der medizinischen Verwendung. Aufgrund vielfältiger Anwendungen solcher Polymere, die zu nicht-invasiven Produkten abgebaut werden, steigt das Interesse an remontierbaren Polymeren mit genau definierten Strukturen.

Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung Polymere auf der Basis von 4-Hydroxyalkansäuren mit definierter Struktur herzustellen.

Als Lösung dieser Aufgabe wurde gefunden, daß in 4-Stellung hydroxylierter, gesättigter aliphatischer Monosaccharide

carbonsäuren vorzugsweise der Kettenlänge C₈ bis C₁₆ (wobei n = 2 bis 14) und 4-Hydroxybuttersäure, als Ausgangsstoff zur Herstellung von sowohl numerischen Polyestern als auch von Polyesteren, die durch einen Gehalt an ≥ 40 mol %, ≥ 60 mol %, ≥ 70 mol % oder ≥ 80 mol % an 4-Hydroxyalkansäuren gekennzeichnet sind, verwendet werden können, wobei die Polymerisationsreaktion mit Hilfe von bestimmten Mikroorganismen und/oder von heterotischen Metallen erfolgen kann.

Eine derartige Synthese zu solchen Polyestern war nicht bekannt und war auch nicht als notwendig zu erwarten. Die Polymeren, die bei der Polymerisation aus wässriger, teilweise wässrig-alkoholischer Copolyester erhalten werden können, die bei Verwendung von HSB als Katalysatoren¹ entstehen, verwenden Anteil von B bis 32 mol-% HSB enthalten (M. Kurusaka et al. 1989, loc. cit.) und zum anderen nur die Diäthylensynthese zu poly(HSB) bekannt ist. Die mikrophasige Verteilung von vernetzten Polymeren und Vernetzungen mit 40 mol % an 4-Hydroxyalkylgruppen aus 4-Hydroxyalkylgruppen modifiziert daher als nach durchführbar betrachtet werden.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß mit Mikroorganismen, von denen bekannt ist, daß sie SHB verwerten und in Form von Poly(SHB) akkumulieren (z. B. Dawes, K. A. und F. J. Senior, 1973 loc. cit.) oder die auch still verwertet können und bekannterweise nur solche

Copolymerisate erreichen die innerhalb eines begrenzten Bereichs (von einem zutägigen Anteil von Poly(4111)) herstellbaren (2–37 mol %) die erfindungsgemäßen milchigen Polyester mit entsprechenden 4-Hydroxypalkeatanteilen, insbesondere der Kettenlänge C₁₆ bis C₂₀, wachstumsfähige 4-Hydroxypalkeatanteile, hergestellt werden können, wenn die Polymerisation ein Wachstumsmedium oder entsprechende 4-Hydroxypalkeatanteile, angegeben wird. Wenn derartige Mikroorganismen einem Mutationsverfahren unterzogen werden, können Mutanten isoliert werden, die solche Polyester anreichern können, selbst in isolierten Medien.

Somit sind auch die Mikroorganismen, die zur Synthese dieser Poly(4-Hydroxyalkansäure) aus den entsprechenden 4-Hydroxyalkansäuren befähigt sind, Gegenstand der vorliegenden Erfindung, als auch solche, die durch Mutation dieser Mikroorganismen erhalten werden können.

Gemäß vorliegender Erfindung kann die Herstellung der erfindungsgemäßen Polyester, durch ein Verfahren erfolgen, welches die folgende Schritte umfaßt:

1. Aromatisierung und Seitenkettengänge: durch Reaktion eines Mälekonsäureamids mit der Hirschtiaurein einer Reichenauer neuen Mutante durch welche zur Synthese eines aus 4-Hydroxyalkansäuren bestehender Kettengänge der Kettengänge: Ca. 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, 288, 290, 292, 294, 296, 298, 300, 302, 304, 306, 308, 310, 312, 314, 316, 318, 320, 322, 324, 326, 328, 330, 332, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 350, 352, 354, 356, 358, 360, 362, 364, 366, 368, 370, 372, 374, 376, 378, 380, 382, 384, 386, 388, 390, 392, 394, 396, 398, 400, 402, 404, 406, 408, 410, 412, 414, 416, 418, 420, 422, 424, 426, 428, 430, 432, 434, 436, 438, 440, 442, 444, 446, 448, 450, 452, 454, 456, 458, 460, 462, 464, 466, 468, 470, 472, 474, 476, 478, 480, 482, 484, 486, 488, 490, 492, 494, 496, 498, 500, 502, 504, 506, 508, 510, 512, 514, 516, 518, 520, 522, 524, 526, 528, 530, 532, 534, 536, 538, 540, 542, 544, 546, 548, 550, 552, 554, 556, 558, 560, 562, 564, 566, 568, 570, 572, 574, 576, 578, 580, 582, 584, 586, 588, 590, 592, 594, 596, 598, 600, 602, 604, 606, 608, 610, 612, 614, 616, 618, 620, 622, 624, 626, 628, 630, 632, 634, 636, 638, 640, 642, 644, 646, 648, 650, 652, 654, 656, 658, 660, 662, 664, 666, 668, 670, 672, 674, 676, 678, 680, 682, 684, 686, 688, 690, 692, 694, 696, 698, 700, 702, 704, 706, 708, 710, 712, 714, 716, 718, 720, 722, 724, 726, 728, 730, 732, 734, 736, 738, 740, 742, 744, 746, 748, 750, 752, 754, 756, 758, 760, 762, 764, 766, 768, 770, 772, 774, 776, 778, 780, 782, 784, 786, 788, 790, 792, 794, 796, 798, 800, 802, 804, 806, 808, 810, 812, 814, 816, 818, 820, 822, 824, 826, 828, 830, 832, 834, 836, 838, 840, 842, 844, 846, 848, 850, 852, 854, 856, 858, 860, 862, 864, 866, 868, 870, 872, 874, 876, 878, 880, 882, 884, 886, 888, 890, 892, 894, 896, 898, 900, 902, 904, 906, 908, 910, 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924, 926, 928, 930, 932, 934, 936, 938, 940, 942, 944, 946, 948, 950, 952, 954, 956, 958, 960, 962, 964, 966, 968, 970, 972, 974, 976, 978, 980, 982, 984, 986, 988, 990, 992, 994, 996, 998, 1000, 1002, 1004, 1006, 1008, 1010, 1012, 1014, 1016, 1018, 1020, 1022, 1024, 1026, 1028, 1030, 1032, 1034, 1036, 1038, 1040, 1042, 1044, 1046, 1048, 1050, 1052, 1054, 1056, 1058, 1060, 1062, 1064, 1066, 1068, 1070, 1072, 1074, 1076, 1078, 1080, 1082, 1084, 1086, 1088, 1090, 1092, 1094, 1096, 1098, 1100, 1102, 1104, 1106, 1108, 1110, 1112, 1114, 1116, 1118, 1120, 1122, 1124, 1126, 1128, 1130, 1132, 1134, 1136, 1138, 1140, 1142, 1144, 1146, 1148, 1150, 1152, 1154, 1156, 1158, 1160, 1162, 1164, 1166, 1168, 1170, 1172, 1174, 1176, 1178, 1180, 1182, 1184, 1186, 1188, 1190, 1192, 1194, 1196, 1198, 1200, 1202, 1204, 1206, 1208, 1210, 1212, 1214, 1216, 1218, 1220, 1222, 1224, 1226, 1228, 1230, 1232, 1234, 1236, 1238, 1240, 1242, 1244, 1246, 1248, 1250, 1252, 1254, 1256, 1258, 1260, 1262, 1264, 1266, 1268, 1270, 1272, 1274, 1276, 1278, 1280, 1282, 1284, 1286, 1288, 1290, 1292, 1294, 1296, 1298, 1300, 1302, 1304, 1306, 1308, 1310, 1312, 1314, 1316, 1318, 1320, 1322, 1324, 1326, 1328, 1330, 1332, 1334, 1336, 1338, 1340, 1342, 1344, 1346, 1348, 1350, 1352, 1354, 1356, 1358, 1360, 1362, 1364, 1366, 1368, 1370, 1372, 1374, 1376, 1378, 1380, 1382, 1384, 1386, 1388, 1390, 1392, 1394, 1396, 1398, 1400, 1402, 1404, 1406, 1408, 1410, 1412, 1414, 1416, 1418, 1420, 1422, 1424, 1426, 1428, 1430, 1432, 1434, 1436, 1438, 1440, 1442, 1444, 1446, 1448, 1450, 1452, 1454, 1456, 1458, 1460, 1462, 1464, 1466, 1468, 1470, 1472, 1474, 1476, 1478, 1480, 1482, 1484, 1486, 1488, 1490, 1492, 1494, 1496, 1498, 1500, 1502, 1504, 1506, 1508, 1510, 1512, 1514, 1516, 1518, 1520, 1522, 1524, 1526, 1528, 1530, 1532, 1534

[illegible]

Inkultivation in einem Medium mit bekannten Zusammensetzung an Nährstoffquellen, Mineralstoffen und Spurenelementen bei einer Temperatur zwischen 20 und 40°C, vorzugsweise bei 30°C, wie es beispielsweise in der EP-A 2 86 808 offenbart wird, in Gegenwart einer entsprechenden 4-Hydroxyalkansäure.

Die Herstellung der Mutanten des erfindungsgemäßen Mikroorganismus als Reinkultur kann über folgende Mutationen, Anreicherungen, Selektion und Kultivierungsverfahren erfolgen.

Zur Auslösung der Mutation können die betreffenden Mikroorganismen nach Standardverfahren mit bekannten physikalischen oder physikalischen Mutagenen behandelt werden. Beispielsweise können die Zellen für diesen Zweck in Gegenwart von Nitrosylsulfid, Nitrit oder Ethylnitrosalanaloge inaktiviert oder energiereicher Strahlung ausgesetzt werden.

Die Ausbreitung der Mutation erfolgt in entsprechender Weise wie bei den Wildtyp-Zellen für die Selektion der Mutanten gegen sich Dichtegradunterschiede.

Es wurde jedoch gefunden, daß die Isolierung von Mutanten besonders gut gelingt, wenn sie über eine Zentrifugation in einem Formalschichtgradienten, beispielsweise nach Schubert, P. et al., J. Bact. 128: 5817-5819, 1968, durchgeführt wird.

Die Kultivierung der erfindungsgemäßen Mikroorganismen und der daraus erhaltenen Mutanten kann in üblichen Komplexmedien mit den bekannten synthetischen oder natürlichen Kohlenstoffquellen (C-Quelle) und mit den bekannten Stickstoffquellen und Mineralstoffen und Spurenelementen, wie sie beispielsweise in der EP-A 2 86 808 oder von Schubert, P. et al., 1968, bekannt gemacht werden, erfolgen.

Überraschenderweise wurde auch gefunden, daß mit den gefundenen Mikroorganismen schon beim ersten Schritt der Kultivierung eine der entsprechenden 4-Hydroxyalkansäuren dem Medium zugegeben werden kann und daß gleichzeitig mit der Zellvermehrung eine Synthese und Anreicherung der erfindungsgemäßen Polyester erfolgt. Dieses Verfahren hat den großen Vorteil, daß die von weiterer durchlaufende Züchtung zum Zweck der Anreicherung der erfindungsgemäßen Polyester schon präkultivierte Zellen zur Verfügung stehen und damit ein schnelleres Umschalten vom Zellwachstum auf Speicherung der erfindungsgemäßen Polyester erfolgen kann.

Diese erfolgreiche Durchföhrung der Anreicherung der erfindungsgemäßen Mikroorganismen in Gegenwart einer 4-Hydroxyalkansäure, entweder als einzige C-Quelle oder zusammen mit einer oder mehreren weiteren der bekannten C-Quellen, war nicht zu erwarten, da bei vergleichbaren Verfahren bisher nur bei einem der notwendigen zweiten Kultivierungsstadium das Wachstum mit der mäßig gebrauchten C-Quelle, beispielsweise mit einer Poly(3-Hydroxybuttersäure), unterstützt wurde (s. B. EP-A 2 86 808).

Die Dauer der Kultivierung der erfindungsgemäßen Mikroorganismen und der daraus erhaltenen Mutanten richtet sich nach den Kulturbedingungen, die sich in der Hauptsache nach der Temperatur, dem Sauerstoffgehalt des Mediums (aerobe Bedingungen) und nach dem Nährstoff (Menge der C-Quelle, der Mineralstoffe, der Spurenelemente, pH-Wert) richtet. Für die erfindungsgemäßen Mikroorganismen und die daraus erhaltenen Mutanten sind keine besonderen, dem Fachmann wohlbekannten Kulturbedingungen zu berücksichtigen und es können jene Bedingungen gewählt werden, wie

sie beispielsweise in der EP-A 2 86 808 angegeben werden.

Die Menge der jeweils eingesetzten 4-Hydroxyalkansäure richtet sich nach dem jeweiligen Mikroorganismus bzw. dem daraus erhaltenen Mutantenstamm. Es kann jedoch von Konzentrationen im Bereich von 0,1 M (1000 mg/l) entsprechend 1 g 4-Hydroxyalkansäure pro Liter Kulturbedium, bis 100 g (100.000 mg/l) entsprechend 100 g/liter, insbesondere 0,2% (2000 mg/l) bis 5% (50.000 mg/l) angegeben werden.

Die Zehrung kann allgemein während der lag-Phase bis in die stationäre Phase erfolgen, vorzugsweise in der stationären Phase. Die Culturen können entweder nach einmaliger Kultur in zwei Gewässern aus dem Medium gewonnen (Batch- oder fed-batch-Verfahren) oder laufend über eine kontinuierliche Kultur erhalten werden, beispielsweise durch abwechselnde Zentrifugations- oder Filtrationsverfahren.

Die gereinigten Zellen können gegebenenfalls nach Waschen, beispielsweise mit einem Puffer vorwählender Weise mit einem Phosphatpuffer, insbesondere mit einem Natriumphosphatpuffer mit neutralem pH (pH 7,0), getrocknet, lyophilisiert oder durch Sprühföhrung behandelt werden.

Die Gewinnung der erfindungsgemäßen Polyester kann nach bekannten Methoden erfolgen, bevorzugt wird die Lyophilisation des Lyophilisates mit organischen Lösungsmitteln, insbesondere durch Ethanol- oder Kohlenwasserstoffe, beispielsweise durch Chloroform oder Methyläthylketon.

Die erfindungsgemäßen Polyester sind als Thermoplast leicht zu verarbeiten und vielseitig verwendbar. Beispielsweise in der Chemie für Gegenstände aus Wunderschiff (z. B. Naturmaterial, Klebstoff) als Reaktionskomponente für Knochen (wie z. B. Transmittier-Platten, Schichten, Dichtung) als Textil-, Faser- oder Abdeckmaterial (wie z. B. Gewebe, Vlies, Watte) in der Pharmazie (wie z. B. als Hilfsstoff, Trägermaterial, Präparationsmittel für Arzneistoffe) zur Verankerung und Mikroverkapselung von Substanzen und Wirkstoffen (wie z. B. Pharmazeutika, Enzyme, Diagenetika, Aromastoffe, Lebensmittelzusatzstoffe, Farbstoffe); zur Herstellung abbaubarer Verpackungsmittel (wie z. B. Folien, Hohlkörper wie Flaschen, Ampullen, Dosen, Behälter, Schalen, Kessel, zur Herstellung anderer Gegenstände wie z. B. Filme, Fasern, Folien) oder Formkörper des täglichen Bedarfs, bei denen eine Abbaufähigkeit in der Umwelt erwünscht ist als Ausgangsprodukt (System) für andere chemische Verbindungen.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, wobei hervorzuheben ist, daß die unter den Beispielen angegebenen Verfahren grundsätzlich auch für andere Mikroorganismen, insbesondere der Gattung der Alkylgenen, Pseudomonas, Acetobacter, Novorhizium, Acetivibrio, Bacillus, Azotobacter, Aquaspirillum, Rhodospirillum, Paracoccus, vorzugsweise solchen, von denen bekannt ist, daß sie zur Synthese und Anreicherung von Poly(3-Hydroxybuttersäure) befähigt sind (Dawes, V. A. und P. J. Senior, 1973, loc. cit., kann endbar sind).

Beispiel 1

A. Herstellung der Mutante SK 2613 aus Akaligenes europaeus Stamm IMP 722 (DSMZ 5630, hinterlegt nach Budapest, Vorratssignatur 01.11.1984).

Zellen von A. europaeus Stamm IMP 722 wurden in einem Komplexmedium (wie unter B. angegeben) in Ge-

-X

Die Analyse des erhaltenen Polymeren ergibt einen Polyestergehalt von 12,8 Gew.-% des Trockenzellmasses. Das Polymer entstand ausschließlich aus Einheiten von 4-Hydroxybuttersäure (4HB)-Monomeren und lag somit als Homopolymer vor.

Beispiel 2

Es wurde wie unter Beispiel 1 angegeben verfahren, außer das anstatt des Mutantensammes SK2b1) der Wildtyp-Stamm A. eutrophus IMP222 verwendet wurde.

Die Analyse des vom Wildtyp-Stamm erhaltenen Polymer ergab einen Polyestergehalt von 21,5 Gew.-% der Trockenzellmasse. Das Polymer bestand aus 92,1 mol-% 4HB und 7,9 mol-% 3-Hydroxybuttersäure (3HB).

Beispiel 3

Es wurde Beispiel 1 B und C. wiederholt außer das ein Wkhtyp-Stamm von *Pseudomonas* sp. anstelle des Mittelnagel Stammes SH2813 verwendet wurde.

Die Analyse des von dieser *Pseudomonas*-Mutante erhaltenen Polymers ergab einen Polymergehalt von 18 Gew.-% der Trockenschmelze. Das Polymer besteht ausbutylisch aus HB und lag somit als Homopolymer vor.

Beispiel 4

Die Kultivierung erfolgte in diesem Fall in einem Zweischrittverfahren unter Verwendung des Wildtyp-Stamms *A. eutrophus* Stamm JMF222. Im ersten Schritt wurde Stamm JMF222 in einem Komplexmedium (wie unter Beispiel 1 angegeben) für 48 h bei 30°C unter aeroben Bedingungen inkubiert.

Im zweiten Schritt wurden die Zellen über Zeolithen gereinigt und in einem Mineralabscheidungsmedium (wie Beispiel 1), jedoch ohne NH_4Cl , suspendiert. Das Medium wurde mit 4-Hydroxybuttersäure (26%, w/w) versuppliert. Die Zellen, die aufgrund des Fehlens einer Siliciumquelle nicht wachsen konnten, wurden bei 37°C für 48 h unter Bedingungen ruhender Bakterienkultur über Zeolithen suspendiert und mit Natriophosphatpuffer (pH 5,0) gewaschen, gefroren und lyophilisiert. Die Bestimmung des Gehalts und der Zusammensetzung des erhaltenen Polymers erfolgte wie unter Beispiel 1 angegeben. Der Gehalt an erhaltenem Copolymer betrug 62 Gew.-% der Trockenzellmasse. Das Copolymer bestand aus 78,9 mol-% 4HB und 21,1 mol-% 3HB.

Beispiel 5

Es wurde Beispiel 1 B. und C. wiederholt, außer dass *Azotobacter* sp. DSM 1721 anstelle von *A. eutrophus* JM²222 (Beispiel 2) verwendet wurde.

Parents: 15 per 100 bc

1. Polyester auf der Basis von 4-Hydroxyalkansäuren.
2. Polyester nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet

2 ml einer stationären Vorkultur der aus Schritt A erhaltenen Mutante von SK2613 (50 ml, 30°C Schüttelkultur) in einem Komplettmedium, bestehend aus Beef extract (3 g) und Pepton (5 g) gelöst in einem Liter deionisiertem Wasser, wurden in 50 ml eines Mineralnährmediums der Zusammensetzung

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$	40 g
$\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1.5 g
NH_4Cl	0.5 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0.2 g
$\text{FeCl}_3 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0.02 g
$\text{Fe(III)NH}_4\text{-Citrat}$	0.012 g

gelöst in einem Liter deionisiertem Wasser, welches 10 ml einer Spurenelementlösung enthielt, der Zusammensetzung

Triplex II	500 mg
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	200 mg
$\text{ZrSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	10 mg
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	3 mg
H_3BO_3	30 mg
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	20 mg
$\text{CuCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	1 mg
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	3 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	3 mg

gelöst in einem liter deionisiertem Wasser, supplementiert mit 0,5% (wt/vol) 4-Hydroxybuttersäure (Natriumsalz), injiziert und unter aeroben Bedingungen in einem Schüttelkolben bei 30°C für 48 h kultiviert.

C. Charakterisierung des erhaltenen Polyester

Die aus Schritt B erhaltenen Bakterien wurden über Zentrifugation geerntet, mit Natriumphosphatpuffer (pH 7.0) gewaschen, getrocknet und lyophilisiert. Die Zellen wurden anschließend einer Methanoxyse nach Brandt, H. et al., Appl. Environ. Microbiol. 54, 1977 - 1982, 1968) unterworfen. Der Gehalt und die Zusammensetzung des in der Zelle akkumulierten Polymers wurde über Gaschromatographie und Methylieren von Hydroxysäuren als Referenzsubstanzen

7
 zeichnen, daß sie thermoplastische Polyester sind.
 3. Polyester nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Gehalt an > 40 mol-% einer 4-Hydroxybenzoesäure enthalten.
 4. Polyester nach Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die 4-Hydroxybenzoesäure Carbo- 5
 Ce-4-Hydroxyalkansäuren sind.
 5. Polyester nach Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus 4-Hydroxybenzoesäure 10
 Lactonen bestehen.
 6. Verfahren zur Herstellung eines Polyesters nach einem der Ansprüche 1 bis 5 unter Verwendung von Mikroorganismen.
 7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen Bodenzucker- 15
 gäruner sind.
 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen ausgewählt sind aus den Gattungen Acetivibrio, Pseudomonas, 20
 Acetobacter, Nocardia, Actinomyces, Bacillus, Azotobacter, Agrobacterium, Rhodospirillum, Paracoccus.
 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, 25
 dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen Mutanten sind.
 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen und die daraus erhaltenen Mutanten in Gegenwart einer 4-Hydroxyphenylsäure angezüchtet, angereicht oder kultiviert werden und nach der Zellzerstörung der Polymer nach Ansprüchen 1 bis 5 gewonnen 30
 werden.
 11. Polyester, herstellbar nach einem Verfahren gemäß Anspruch 6 bis 10.
 12. Verwendung eines Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 6 bis 9 zur Herstellung von 35
 Polyesterwachst. Ansprüchen 1 bis 3.
 13. Mikroorganismen zur Herstellung eines Polyesters nach Ansprüchen 1 bis 5.
 14. Mikroorganismen nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß es Bodenmikroorganismen 40
 sind.
 15. Mikroorganismen nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß sie ausgewählt sind aus der Gattung Acetivibrio, Pseudomonas, Acetobacter, 45
 Nocardia, Actinomyces, Bacillus, Azotobacter, Agrobacterium, Rhodospirillum, Paracoccus.
 16. Der Mikroorganismus SK 2611 im Akletoleus eutrophus Stamm JMI²22, DLM 5630 hinterlegt am 02.11.1989.
 17. Verwendung eines Polyesters nach Ansprüchen 1 bis 5 in der Chirurgie, Pharmazie, zur Verklebung und Mikroverkapselung von Substanzen und 50
 Verfahren zur Herstellung abbaubarer, Verabreichungsmittel, Gegenstände und Formkörper.
 18. Formkörper, bestehend aus einem Polyester nach Ansprüchen 1 bis 5.
 55

—X

- Leersseite -

X

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.